

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1964

337^{N°}

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

PAR

WEILL, Claude, Paul

Né le 18 Juin 1934, à Paris (17^e)

Présentée et soutenue publiquement le

1964

CONTRIBUTION AU DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE
DES ASPERGILLOSES

Président : Mr. P. BARBIER, Professeur

DUPUYTREN-COPY

9, Rue Dupuytren
PARIS VI.

1964

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1964

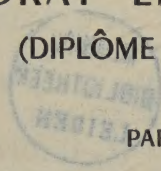
N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLÔME D'ÉTAT)



PAR

WEILL, Claude, Paul

Né le 18 Juin 1934, à Paris (17^e)

Présentée et soutenue publiquement le

**CONTRIBUTION AU DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE
DES ASPERGILLOSES**

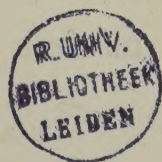
Président : Mr. P. BARBIER, Professeur

DUPUYTREN-COPY

9, Rue Dupuytren

PARIS VI^e

1964



PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. ALAJOUANINE (T.), AUBIN (A.), BENARD (H.),
BULLIARD (H.), CADENAT (F.), CHABROL (E.), DEBRE (R.),
FEY (B.), GALLIARD (H.), GASTINEL (P.), HALPHEN (E.),
HAZARD (R.), HEUYER (G.), LANTUEJOUL (P.), LAROCHE
(G.), LAVIER (G.), LEVY-SOLAL (E.), LIAN (C.),
MATHIEU (P.), MOCQUOT (P.), MONOD (R.), MOREAU (R.),
MOULONGUET (P.), MOUQUIN (M.), OLIVIER (E.), PASTEUR
VALLERY-RADOT, PETIT-DUTAILLIS (D.), PIEDELIEVRE (R.),
QUENU (J.), RICHET (C.), SENEQUE (J.), STROHL (A.),
TANON (L.), VERNE (J.).

DOYEN : Gaston CORDIER

1er ASSESSEUR : D. BARGETON

2me ASSESSEUR : Paul CASTAIGNE

I.- PROFESSEURS

1°)- CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a)- Professeurs titulaires :

MM.

Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale	(JAYLE (M.-F.)
	(SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Embryologie	TUCHMANN (H.)

mm.

Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière)	JOANNON (P.)
Histologie	GIROUD (A.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et Virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-G.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
Pathologie exotique	N...
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	N...
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	BOUDIN (G.)
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
Physiologie	(BINET (L.)
Physiologie et pathologie obstétr.	(BARGETON (D.)
Physique médicale	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	(DOGNON (A.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	(DJOURNO (A.)
Thérapeutique	DESGREZ (H.)
Thérapeutique appliquée	CAUCHOIX (J.)
	CONTE (M.)
	LAMOTTE (M.)

b)- Professeurs à titre personnel :

Biochimie médicale	(DESGREZ (P.)
Biologie médicale	(POLONOVSKI (J.)
Hygiène et médecine préventive	BOURLIERE (F.)
Pharmacologie	DEPARIS (M.)
Physiologie	LEVY (Mlle J.)
Physique médicale	PARROT (J.)
	KELLERSHOHN (L.)

2°)- CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a)- Professeurs titulaires :

mm.

Clinique carcinologique chirurgicale	
(Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	SOULIE (P.)
(Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
(Cochin	LEGER (L.)
Cliniques (Cochin	ABOULKER (P.)
chirurgicales (Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
(Pitié	CORDIER (G.)
(Saint-Antoine	GOSSET (J.)
(Salpêtrière	SICARD (A.)
(Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique de chirurgie infantile et	
orthopédique (Enfants-Malades)	FEVRE (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique	
et traumatologique (Cochin)	MERLE d'AUBIGNE (R.)
Clinique de chirurgie cardio-	
vasculaire (Broussais)	GAUDART d'ALLAINES (F.de)
Clinique de chirurgie pleuro-	
pulmonaire (Laënnec)	MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale	
(Enfants-Malades)	LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)	HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et	
syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des Enfants	
(Enfants-Malades)	CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses	
(Claude-Bernard)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et	
de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques	
(Necker)	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang	
(Broussais)	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système	
nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P.)
(Boucicaut	MILLIEZ (P.)
Cliniques médicales (Broussais	LENEGRE (J.)

mm.

Cliniques médicales	(Cochin.....)	JUSTIN-BESANÇON (L.)
	(Cochin.....)	BROUET (G.)
	(Hôtel-Dieu.....)	BARIETY (M.)
	(Lariboisière.....)	SEZE (S. de)
	(Pitié.....)	DREYFUS (G.)
	(Saint-Antoine.....)	KOURILSKY (R.)
Clinique d'hydrologie et de climato-		
logie (Bichat).....		DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique		
(Broussais).....		GENNES (L. de)
Clinique médico-sociale du diabète		
sucré et des maladies de la		
nutrition (Hôtel-Dieu).....		DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié).....		DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière).....		GARCIN (R.)
	(Baudelocque.....)	LACOMME (M.)
Cliniques obstétricales	(Foch (Suresnes).....)	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique		
(Port-Royal).....		VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu).....		RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique		
(Lariboisière).....		AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puéricul-		
ture (Saint-Vincent-de-Paul).....		LELONG (M.)
Clinique de pédiatrie sociale		
(Enfants-Malades).....		MARIE (J.)
Clinique de pneumo-phthisiologie		
(Laënnec).....		BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie		
infantile (Salpêtrière).....		MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale		
et sociale (Cochin).....		COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié).....		DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale		
(Vaugirard).....		ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale		
(Saint-Antoine).....		LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique.....		GAULTIER (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique		
et traumatologique.....		PADOVANI (P.)
Séméiologie médicale.....		DOMART (A.)
Séméiologie et clinique chirurgicales.....		POILLEUX (F.)
Clinique urologique (Necker).....		COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première		
enfance (Trousseau).....		TURPIN (R.)

b)- Professeurs à titre personnel :

mm.

Médecine (BOUR (H.)
 (LHERMITTE (F.)
 (PEQUIGNOT (H.)

II.- PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES
 ET MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

mm.

Anatomie (CABROL (C.)
 (COUINAUD (C.)
 (GILLOT (C.)
 (OLIVIER (G.)
 (Pr. s. ch.
 (GAUTHIER-VILLARS (Mlle P.)
 (Pr. s. ch.
 (ABELANET (R.)
 Anatomie pathologique (CHOMETTE (G.)
 (GOUYGOU (Ch.), M. conf.
 (NEZELOFF (Ch.)
 (ORCEL (L.)
 (PAILLAS (J.)
 Anesthésiologie (KERN (E.)
 (VOURC'H (G.)
 (BARBIER (P.), Pr.s.ch.
 Bactériologie (CHRISTOL (D.)
 (LE MINOR (L.)
 (TOURNIER (P.)
 (BAULIEU (Et.),
 (M. Conf.
 (BOURILLON (R.)
 Biochimie médicale (CARTIER (P.)
 (DREYFUS (J.-Cl.)
 (GONNARD (P.)
 (KRUH (J.)
 (JEROME (H.)
 Biologie appliquée à l'Education
 physique et aux Sports PLAS (F.)
 (BOIRON (M.)
 (DENOIX (P.)
 Carcinologie (MATHE (G.)
 (SELIGMANN (M.)

mm.

Dermato-syphiligraphie	(CIVATTE (J.) (DUPERRAT (B.)
Electro-radiologie	LEDOUX-LEBARO (G.) (BESSIS (M.) (BILSKI-PASQUIER (G.)
Hématologie	(DAUSSET (J.) (DUHAMEL (G.) (COUJARD (R.), Pr.s.ch.
Histologie	(MAROIS (M.) (RACADOT (J.) (BESANÇON (F.)
Hydrologie	(CORNET (A.) (BOYER (J.), Pr.s.ch. (BLANCHER (G.)
Hygiène	(CORRE-HURST (Mme L.) (SAPIN-JALOUSTRE (H.) (BASTIN (R.), Pr.s.ch.
Maladies infectieuses	(DUPONT (V.) (FOURNIER (E.)
Médecine légale	(GUENIOT (M.) (HADENGUE (A.)
Médecine du travail	ALBAHARY (C.)
Neuro-chirurgie	PERTUISET (B.)
Neurologie	LAPRESLE (J.) (GRANJON (A.) (HERVET (E.) (LE LORIER (G.) (LEVY (J.) (MORIN (P.)
Obstétrique	MUSSET (R.) (ROBEY (M.) (SENEZE (J.) (SUREAU (C.) (THOYER-ROZAT (J.) (BREGEAT (P.)
Ophthalmologie	(DUBOIS (A.) (SARAUX (H.) (JUDET (R.)
Orthopédie	(MEARY (R.) (POSTEL (M.) (RAMADIER (J.)
Oto-rhino-laryngologie	(DEBAIN (J.) (PIALOUX (P.)

mm.

Parasitologie	(GOLVAN (Y.) (LAPIERRE (J.) (BARCAT (J.) (BINET (J.-P.) (CERBONNET (G.) (CHATELIN (C.-L.) (DUBOST (Ch.) (DUBOST (Cl.) (FAUREL (J.) (FLABEAU (F.) (GARBAY (M.) (GARNIER (H.) Pathologie chirurgicale.....(GAUDART d'ALLAINES (Cl. de) (GERMAIN (A.) (LATASTE (J.) (LOYGUE (J.) (MERCADIER (M.) (NATALI (J.) (PELLERIN (D.) (PERROTIN (J.) (ROBERT (H.) (THOMERET (G.)
Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.) (BENHAMOU (J.-P.) (BERTHAUX (P.) (BOIVIN (P.) (CROSNIER (J.) Pathologie expérimentale.....(HARTMANN (L.) (LOEPER (J.), Pr.s.ch. (MAURICE (J.) (MIKOL (Cl.) (RICHT (G.) (AUSSANNAIRE (M.) (BOUVIER (J.) (BOUVRAIN (Y.) (BRICAIRE (H.) (BRISSAUD (H.) (BROCARD (H.) Pathologie médicale
	(BUGE (A.) (CATINAT (J.) (CHRETIEN (J.) (COBLENTZ (B.) (CONTAMIN (F.) (COURY (C.)

MM.

	(ETIENNE (J.-P.)
	(FREZAL (J.)
	(FRITEL (D.)
	(HENNEQUET (A.)
	(HIMBERT (J.)
	(HOUSSET (E.)
Pathologie médicale.....	(LAROCHE (Cl.)
	(LESOBRE (R.)
	(LEVEQUE (B.)
	(MACREZ (C.)
	(MOREAU (L.)
	(NICK (J.)
	(ROYER (P.)
	(TOURNEUR (R.)
	(WOLFROMM (R.)
	(LAFOURCADE (J.)
	(LEPERCQ (G.)
	(MANDE (R.)
Pédiatrie-Puériculture	(MOZZICONACCI (P.)
	(POLONOVSKI (C.)
	(ROSSIER (A.)
	(VIALATTE (J.)
Pharmacologie.....	(BOISSIER (J.)
	(LECHAT (P.)
	(BARRES (G.)
	(DEJOURS (P.), Pr.s.ch.
	(DURAND (J.)
Physiologie.....	(GIRARD, M. conf.
	(HUGELIN (A.)
	(SCHERRER (J.)
	(CHANTEUR (J.)
	(GOUGEROT (L.), M. conf.
	Pr. s. ch.
Physique médicale.....	(GREMY (F.), M. conf.
	(MILHAUD (G.)
	(PELLERIN (P.)
	(ROUCAYROL (J.-Cl.)
	(TUBIANA (M.), M. conf.
	(KREIS (B.)
Pneumo-ptisiologie.....	(MEYER (A.)
	(RENAULT (P.)
Psychiatrie	(PICHOT (P.)
	(DENIKER (P.)
Psychiatrie infantile	(DUCHE (D.)
	(FLAVIGNY (H.)

MM.

Rhumatologie.....	DELBARRE (F.), Pr. s. ch. (CERNEA (P.)
Stomatologie.....	(CHAPUT. (Mme A.) M. c. agr. (GRELLET (M.)
Thérapeutique.....	(CHASSAGNE (P.) (MARCHE (J.) (AUVERT (J.)
Urologie.....	(MOULONGUET (A.) (QUENU (L.)

III.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES
CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE
à titre permanent.

MM.

Anatomie.....	DEBEYRE (J.)
Clinique chirurgicale.....	VERNE (J.-M.) (PERRAULT (M.)
Clinique médicale.....	(RAMBERT (P.) (THIEFFRY (S.)
Clinique obstétricale.....	(GRASSET (J.) (MAYER (M.)
Clinique ophtalmologique.....	(DESVIGNES (P.) (OFFRET (G.)
Clinique pédiatrique et puériculture.....	LAPLANE (R.)
Clinique psychiatrique.....	BARUK (H.)
Clinique urologique.....	KUSS (R.)

IV.- PROFESSEURS DETACHES
DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie.....	HAUDUROY (P.), Pr. s. ch.
Pathologie chirurgicale.....	RUDLER (J.), Pr. s. ch.

V.- CHARGES DE COURS D'HYGIENE SCOLAIRE
ET UNIVERSITAIRE

MM. BOLTANSKI (E.)
LAUNAY (C.)

Secrétaire général de la Faculté M. LENA (J.)
Secrétaire principal Mlle CHAINTREUIL (G.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque
Conservateur du Musée d'Histoire de la
Médecine M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs (Mlles DUMAITRE (P.),
 (LE NOIR (G.),
 (QUIEVREUX (E.)
Bibliothécaires (Mmes CONTET (J.),
 (FORGET (F.),
 (Mlle LAURENT (H.)

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. BARBIER

Qui nous a fait l'honneur
d'accepter la présidence
de cette thèse.

Qu'il veuille bien trouver
ici l'expression de notre
respectueuse gratitude.

A MONSIEUR LE DOCTEUR P E S L E

Médecin chef adjoint
du Centre chirurgical Marie Lannelongue

Nous le remercions d'avoir
été notre guide dans ce
travail qui lui doit d'avoir
été mené à bien.

Nous lui exprimons ici toute
notre reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOCTEUR F R A N C H E L

Assistant des Hôpitaux de Paris

Qu'il soit assuré de notre
profond respect, de notre
attachement et de notre
reconnaissance pour son
enseignement.

CONTRIBUTION AU DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

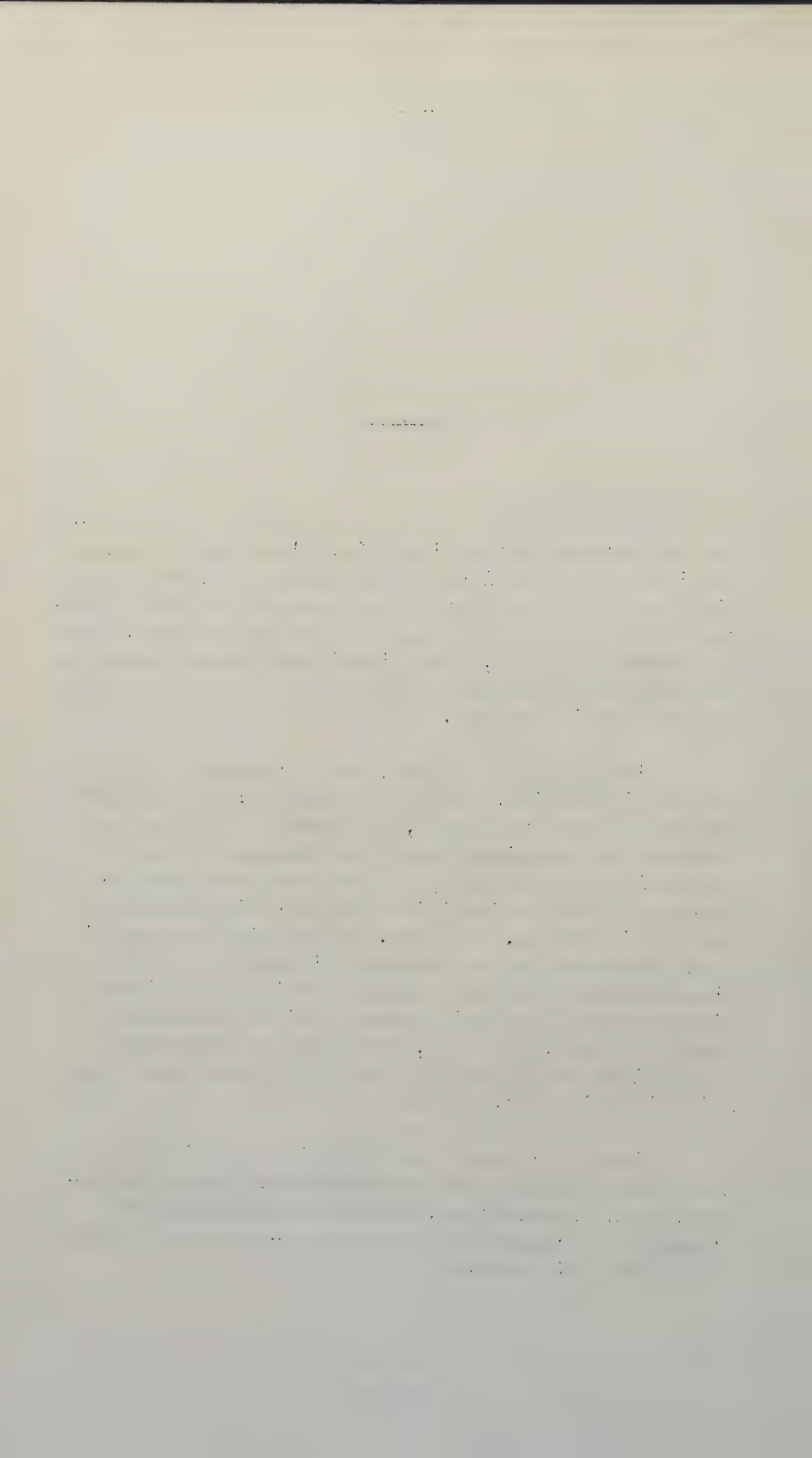
DES ASPERGILLOSES

INTRODUCTION

Depuis quelques années, la mycologie est devenue un nouveau centre d'intérêt, d'une part à cause de l'importance croissante des sciences biologiques, d'autre part à la suite d'une augmentation des atteintes mycosiques. Cette dernière est en relation, pour de nombreux auteurs, avec l'antibiothérapie intensive des populations depuis quinze ans et la sélection des souches ainsi réalisée.

L'ASPERGILLOSE occupe, dans l'ensemble de la pathologie humaine, une place modeste ; mais la difficulté de son diagnostic, la rareté de la mise en évidence du champignon dans les expectorations ou aspirations bronchiques, la fréquence des associations suffisent à justifier une tentative de diagnostic biologique. De plus, il est bien connu et il a été démontré que la présence d'*Aspergillus* dans l'expectoration ne suffit pas à affirmer le diagnostic d'aspergillose ; la présence d'un *Aspergillus* saprophyte est, en effet, fréquente et une preuve sérologique est un appoint non négligeable pour établir l'atteinte pathologique.

C'est à l'étude d'une réaction sanguine que nous avons consacré nos recherches au Centre chirurgical Marie Lannelongue, essayant de préciser et d'adapter à l'aspergillose quelques-unes des méthodes de la sérologie moderne.



HISTORIQUE

L'étude biologique des aspergilloses peut être divisée en deux périodes :

- de 1912 à 1958,
- de 1958 à nos jours.

= Les premiers travaux sur ce sujet sont, en effet, les études par VAUDREMER (21), en 1913, des extraits filtrés d'*Aspergillus fumigatus* et de leur pouvoir inhibiteur sur les cultures de bacille de Koch.

En 1927, eurent lieu les très intéressants travaux de MACAIGNE et NICAUD (10) ; si les tentatives de sporoagglutination, de précipitation, de fixation du complément n'eurent que des résultats négatifs, en revanche ils réussirent à mettre en évidence une réaction allergique de type retardé par cuti-réactions ; ils préparèrent, dans ce but, trois antigènes : deux antigènes fortement chauffés appelés I et II, un autre moins chauffé appelé III. Seul ce dernier leur donna des réactions positives chez leurs malades aspergillaires et négatives chez ceux atteints d'autres affections. Un de leurs malades, tuberculeux pulmonaire, eut une cuti-réaction aspergillaire positive, mais ils prouvèrent sa surinfection par un *Aspergillus* qu'ils isolèrent ensuite de son expectoration.

Ces essais mettaient en évidence l'existence d'une allergie dans l'aspergillose. Mais bien que

ce soit une preuve supplémentaire de l'infestation de ces malades, l'importance des phénomènes allergiques qu'ils déclenchèrent par les intra-dermo-réactions rendit l'emploi de cette technique impossible ; ils virent, en effet, apparaître chez leurs malades la classique triade allergique : réaction locale, réaction générale, réaction focale.

Il est intéressant de noter que si leurs réactions sériques ont échoué, c'est pour deux sortes de raisons :

- D'une part, ils chauffaient leurs antigènes I et II à 75° lors de la préparation, l'antigène III n'étant chauffé qu'à 60°.

- D'autre part, ils utilisaient comme produit de départ des cultures de 48 h. en milieu de RAULIN.

Or, nous savons depuis que les protéines sont thermolabiles et que, de plus, les produits de sécrétion de l'*Aspergillus* apparaissent plus tardivement et de façon successive.

En effet, en 1938, ANSLOW et RAISTRICK (1) isolèrent la fumigatine (3 hydroxy 4 methoxy 2.5. Toluquinone) et en 1942 WAKSMAN, HORNING et SPENCER (22) isolaient la fumigacine dont ils comparaient les propriétés avec la précédente et à laquelle ils trouvaient une activité antibiotique intéressante. Ils montrèrent la sécrétion de fumigacine dans les premiers jours de la culture (entre 3 et 10 jours) avec un résultat optimum en milieu CZAPECK, et celle de la fumigatine beaucoup plus tard, à partir de 4 semaines, et avec un résultat bien supérieur en milieu de RAULIN.

Mais tous ces travaux furent conduits dans le seul but d'un antagonisme possible avec le bacille de Koch. La découverte de ces produits n'a pas, à notre connaissance, comporté d'étude antigénique. Nous ne savons pas encore s'ils sont superposables :

avec tout ou partie des antigènes aspergillaires.

Par la suite, SOLTYS (20), ASHESHOW et STERLITZ (2) et de nombreux auteurs français dont LACHAUX (8), PARENT (13), BOUGUEN (4), LALLEMANT et TOMATIS (9) étudièrent ces produits et leur éventuelle utilisation thérapeutique.

= La deuxième période des études aspergillaires, période sérologique proprement dite, évoquée par PASTEUR VALLERY RADOT et GIROUD en 1928 (15), commence en 1958 avec les travaux de PEPYS et coll. en Grande-Bretagne, SEELIGER en Allemagne et BIGUET, HARVEZ et TRAN VAN KY en France :

PEPYS, RIDDEL, CITRON et coll. (18) montrèrent la puissance antigénique des *Aspergillus*, de façon expérimentale; par l'étude d'animaux de laboratoire préparés (lapins) et fournissant un immum sérum type. En appliquant les méthodes de OUDIN et OUCHTERLONY (12), ils mirent en évidence une réaction antigène anticorps objectivée par la précipitation en gélose ; ils purent comparer leurs résultats avec le sérum de quelques malades atteints d'aspergillose : il y avait similitude de réaction entre le sérum d'animaux préparés expérimentalement par injections d'antigène et celui des malades atteints d'aspergillose ; ils préparaient leurs antigènes soit par dialyse du broyat mycélien, puis lyophilisation, soit en dialysant, puis lyophilisant un milieu de culture d'un mois, remis ensuite en solution saline à la valeur de 10 mg/cc.. Leurs résultats étaient très encourageants.

SEELIGER (19) insista sur l'intérêt considérable de ces méthodes de précipitation pour les études des antigènes multiples des divers champignons pathogènes.

En France, BIGUET, HARVEZ et TRAN VAN KY (3)

appliquèrent ces techniques, ainsi que l'immuno-électrophorèse en gélose à l'étude des antigènes de *Candida Albicans*.

Mais ce n'est que tout récemment que GERNEZ-RIEUX et coll. à Lille (16) d'une part, SEGRETAINE et DROUHET à l'Institut Pasteur de Paris, PESLE et BIDET au Centre Chirurgical Marie Lannelongue d'autre part (5) étudièrent cet aspect sérologique des aspergillo-ses et, en particulier, ces toutes récentes publications sont, à notre connaissance, les premières études immunologiques chez des malades aspergillaires apportant des résultats positifs exploitables :

GERNEZ-RIEUX et BIGUET (6) rapportent 10 cas d'aspergillomes bronchiques étudiés par les deux techniques d'OUCHTERLONY et de GRABAR, parallèlement à 179 malades hospitalisés pour d'autres affections; ils insistent sur la possibilité de fausses réactions positives par la méthode d'OUCHTERLONY.

DROUHET, SEGRETAINE, PESLE et BIDET (5) rapportent 43 cas d'aspergillose vérifiée, étudiés par la méthode d'OUCHTERLONY avec une douzaine d'antigènes différents, tous préparés à partir d'*Aspergillus fumigatus*. Ils ne signalent, après élimination des fausses réactions, aucune précipitine chez leurs sujets de contrôle ; mais, par contre, ils n'obtiennent pas de précipitines chez trois de leurs malades certifiés porteurs d'aspergillomes par l'intervention.

Pour terminer, nous devons citer le très intéressant travail de MORTON et DODGE (11) qui, appliquant la technique de OUDIN précisée par PARLETT à l'étude des précipitations dans la tuberculose, ont insisté sur l'extrême importance du matériel et des méthodes employés, les précipitations en gélose obéissant à des impératifs physico-chimiques très précis.

PLAN DE TRAVAIL

Nous tenterons de confirmer l'intérêt des recherches d'anticorps précipitants dans le diagnostic de l'aspergillose.

Nous nous efforcerons d'apprécier quantitativement le taux d'anticorps circulants chez nos malades; pour ce faire, nous mettrons en oeuvre deux méthodes:

- Inhibition de précipitation par consommation d'antigène.
- Fixation du complément.

Enfin, nous étudierons les réactions sérologiques en fonction de l'évolution clinique et de la guérison.

M A T É R I E L E T T E C H N I Q U E S

La méthode la plus couramment utilisée est celle de la double diffusion, ainsi qu'elle a été proposée par OUCHTERLONY. C'est sur elle que nous avons basé nos travaux.

Composition de la gélose

Elle importe beaucoup, car la vitesse de migration des éléments de la réaction dépend en partie de la teneur en eau de la gélose ; de plus, une concentration saline insuffisante entraînerait l'apparition de précipitations parasites (euglobulines...) qui gêneraient la lecture ; enfin, les manipulations successives auxquelles sera soumise la plaque de gélose (lavages, coloration...) nécessitent l'emploi d'un matériel résistant. C'est pourquoi nous avons adopté la formule suivante :

- Gélose Agar Noble Difco à 1,5 %
dans eau physiologique
- Merthiolate 1 o/ooo.

Préparation de la plaque

Elle est coulée la veille de l'emploi dans un moule stérile ; le plus classique est d'utiliser une boîte de Pétri dans laquelle la gélose est coulée sur une épaisseur d'environ 0,5 cm. Les logettes sont obtenues soit par disposition de moules adéquats avant

la prise en gel du milieu, soit par percement des cupules, à l'emporte-pièce. Il semblerait que les moules métalliques soient préférables aux moules de verre auxquels la gélose adhère, donnant des cupules aux parois souvent déchiquetées ; actuellement, nous utilisons des moules en plastique, ce qui nous paraît le moyen le plus simple et le plus pratique. Le nombre et la disposition des cupules peuvent être variés à l'infini selon les études auxquelles on veut se livrer. Leur diamètre doit être de 8 mm. environ ; l'intervalle optimum entre les cupules de réaction est lui aussi de 8 mm.

La même gélose a été utilisée dans des tubes à essais verticaux selon la méthode de OUDIN, ainsi que dans des tubes d'un diamètre inférieur (5 mm. de diamètre interne).

Matériel antigénique

Ainsi que de nombreux auteurs l'ont pratiqué pour d'autres champignons, nous avons procédé par culture d'*Aspergillus* en milieu synthétique. Nous avons utilisé un milieu de RAULIN fortement saccharosé :

Silicate de potassium.....	0,07 g
Sulfate ferreux.....	0,07 g
Sulfate de zinc.....	0,07 g
Sulfate d'ammonium.....	0,25 g
Carbonate de magnésium.....	0,4 g
Biphosphate d'ammonium.....	0,6 g
Carbonate de potassium.....	0,6 g
Nitrate d'ammonium.....	4 g
Acide tartrique.....	4 g
Eau distillée.....	1500 ml.

On fait dissoudre un à un les sels dans l'ordre et cette solution saline est stérilisée à 115° pendant 20 minutes. On stérilise à part, par filtration, une solution de saccharosé à 30 % ; au moment de l'emploi,

on ajoute stérilement 1,5 cc. de solution de saccharose pour 10 cc. de solution saline, et on répartit dans des ballons de verre stériles, à fond plat, de 30 cm. de diamètre, un litre de solution dans chaque ballon.

Nous ensemençons ce milieu à partir d'une souche d'*Aspergillus fumigatus* isolée chez un de nos malades et qui, après de nombreux essais, s'est avérée la plus fortement antigénique des souches en notre possession. Nous appelons cette souche D, de la première lettre du nom de cette malade.

Le ballon ensemencé est ensuite porté à l'étuve à 37°. Le delta cryoscopique de ce milieu étant au départ de - 0,39, nous considérons que l'élévation de celui-ci à - 0,15° correspond à un stade métabolique optimum. Nous obtenons ce degré de culture au bout de 6 semaines environ. Nous avons alors d'importants gâteaux mycéliens surnageant le liquide.

Nous avons réalisé deux antigènes :

- Antigène cellulaire,
- Antigène soluble, élaboré dans le milieu.

• L'antigène cellulaire est préparé par destruction des cellules mycéliennes par congélations successives à -25° alternant avec des broyages au mortier à la température du laboratoire, suivant le principe décrit par les auteurs italiens (23).

La pâte ainsi préparée a révélé un pouvoir antigénique certain, mais qu'il nous fut impossible de différencier de celui des autres produits isolés de la culture. Des extractions par compression et filtration de ce broyat n'ont apporté aucune précision.

Le caractère laborieux de ces techniques et le peu d'antigène ainsi obtenu nous ont fait préférer

- L'antigène soluble, élaboré dans le milieu.

En effet, nous avons trouvé une antigénicité très grande aux produits d'élaboration du champignon. PESLE et BIDEZ (*) ont étudié les gouttelettes qui apparaissent à la surface du mycélium : ils leur ont trouvé une très grande valeur antigénique ; mais, poursuivant leurs expériences, ils se sont aperçus que cette élaboration était suffisamment abondante dans le liquide de culture pour lui conférer une antigénicité tout aussi importante. C'est là le matériel que nous avons utilisé après que ces auteurs en aient démontré la valeur.

La conservation de ce produit après décantation et stérilisation par filtration, puis addition d'acide mercurothiolique à la dilution finale de 1 o/ooo semble bonne. Notre expérience personnelle donne d'excellents résultats si l'on conserve à l'abri des contaminations.

Nous avons pu appliquer cette technique de préparation à 14 variétés différentes d'*Aspergillus* qui nous ont été fournies par l'Institut Pasteur de Paris (Nous remercions tout spécialement Monsieur SEGRETAINE, Chef du Laboratoire de Mycologie à l'Institut Pasteur de Paris, pour l'aide qu'il nous a donnée), ainsi qu'à des souches isolées chez nos propres malades.

Nous titrons notre antigène depuis que, grâce à l'aide de Madame PARIS, au Laboratoire de l'Institut Fournier, nous nous sommes rendu compte de la capacité de notre système antigène - anticorps de fixer le complément. Nous utilisons comme méthode de titrage la classique méthode de BOERNER et LUKENS dont le principe est le suivant : déterminer la dilution optimale d'antigène à introduire dans la réaction pour obtenir une plus grande sensibilité et éviter le phénomène de zone ; pour ce faire, on met en présence des dilutions de plus en plus grandes d'antigène avec des dilutions de sérum.

Nous avons effectué 63 réactions dont 14 sont des témoins (7 témoins antigène et 7 témoins sérum)

(*) - Communication orale.

et à chacune de ces combinaisons est appliquée une réaction de Kolmer classique.

On utilise comme titre la dilution la plus concentrée qui donne un résultat fortement positif avec la plus petite quantité de sérum. Dans l'exemple ci-joint, on considère que le titre est 1/8. On remarquera à propos l'activité anticomplémentaire de notre antigène pur et dilué au 1/2, mise en évidence par les tubes témoins à ces dilutions.

Dilutions d'antigène

Pas d'antigène	-	-	-	-	-	-	-	
1/64	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
1/32	+++	+++	+++	+	-	-	-	-
1/16	+++	+++	+++	+	-	-	-	-
1/8	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
1/4	+++	+++	++	++	-	-	-	-
1/2	+++	+++	++	++	+	+	+	+
Pur	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+
	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Pas de sérum

Dilutions de sérum

EXEMPLE de TITRAGE d'UN de NOS LOTS d'ANTIGENE

Il s'agit, dans l'exemple cité, de la notation classique de 0 à +++ du degré d'empêchement d'hémolyse dans la réaction de Kolmer.

Chaque nouveau lot de fabrication nécessite un

nouveau titrage, soit par comparaison avec un échantillon d'antigène titré, soit directement avec un sérum ayant servi à un précédent titrage. La lyophilisation du produit étalon nous semble indispensable à l'obtention d'un titre constant.

Techniques utilisées

1- Réactions de précipitation en boîte de Pétri.

Réaction : La technique de la réaction est simple : la gélose, coulée stérilement 24 h. auparavant, est chargée en produits à étudier par remplissage des cupules. Avec un peu d'habitude, la taille des cupules étant identique, il est aisé d'obtenir des doses constantes de produits. La réaction se lit au bout de 48 h., mais il importe de la laisser se prolonger quelques jours de plus (une semaine au maximum), afin de tenir compte d'une éventuelle réaction retardée.

Fixation, coloration : Si, dans la plupart des cas, le trait de précipitation est facilement lisible sans autre artifice, il est pourtant préférable de procéder à une coloration. Il faut pour cela laver les plaques de gélose, afin d'éliminer les substances protéiques non précipitées qui rendraient la lecture impossible. Nous avons trempé les plaques pendant quatre jours dans un bain isotonique de ClNa avec agitation quotidienne, puis nous les avons rincées dans l'eau distillée pendant 24 heures ; nous avons fixé les réactions par trempage pendant 30 minutes dans de l'alcool acétique (alcool à 70° = 98 cc., acide acétique = 2 cc.), suivi d'un nouveau rinçage de quelques heures dans l'eau distillée. La plaque ainsi préparée est alors séchée sur du papier filtre.

Après avoir utilisé pendant quelque temps une solution d'acidoschwartz pour la coloration, nous lui avons préféré l'azocarmin dans lequel baigne la plaque pendant une heure.

On décolore enfin par trempage dans une solution de glycérine à 50 pour mille dans de l'eau dis-

tillée.

Conservation : Les plaquettes ainsi obtenues peuvent être classées et conservées, mais on peut aussi les photographier, encore que les techniques d'éclairage soient fort délicates pour des non spécialistes de la photographie ; l'éclairage rasant nous a semblé indispensable pour réaliser de bonnes photographies.

2- Réactions d'inhibition de précipitation par consommation d'antigène.

Quoique utilisant le même matériel, le principe de cette étude est un peu différent.

Nous mettons en présence pendant 24 heures, à la température du laboratoire, des quantités égales de dilutions de notre antigène avec un sérum de malade supposé contenir des anticorps spécifiques ; il va se produire une combinaison de ces deux facteurs de la réaction immunologique, réaction invisible dans le cas particulier. Nous n'utilisons pas de dilution supérieure au 1/32, car la réaction d'inhibition deviendrait alors ininterprétable, comme l'ont montré les témoins répétés.

Dans un deuxième temps, nous mettons indirectement cette combinaison en évidence par la recherche de l'antigène resté libre, c'est-à-dire non consommé. Pour cela, nous utilisons une deuxième réaction, visible, dite réaction révélate.

Cette épreuve a le double intérêt d'un contrôle de spécificité d'une part et d'une réaction quantitative d'autre part. En effet, nous étudions le degré de consommation d'antigène et, indirectement donc, la richesse en anticorps du sérum de nos malades, par l'utilisation de dilutions d'antigène ; pour cela, nous préparons des dilutions croissantes d'antigène : pur, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ; nous mettons, dans 6 tubes à hémolyse, 0,2 cc. de chacune de ces dilutions

et 0,2 cc. de sérum suspect ; nous laissons en présence 24 h. à la température du laboratoire ; une gamme témoin est préparée de façon identique, mais avec du sérum de sujet sain. Dans un deuxième temps, c'est-à-dire au bout de 24 heures, sont chargées les gélules pour une réaction du type Ouchterlony, comprenant deux cupules disposées de part et d'autre d'une cupule centrale :

. Dans cette cupule centrale, se trouve un immun sérum connu, riche en anticorps.

. Dans une des deux autres, est introduit le mélange antigène dilué à $1/X$ + sérum de malade.

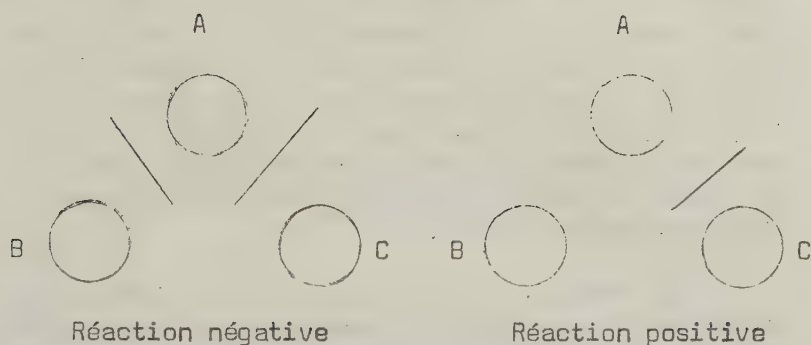
. Dans l'autre, est introduit le mélange antigène dilué à $1/X$ + sérum témoin (Cf. figure).

On utilise donc une série de trois cupules pour chaque dilution, mais on peut réaliser des études en série avec un seul témoin pour chaque dilution et plusieurs sérums de malades.

On procède ensuite comme pour une recherche ordinaire de précipitation, ainsi qu'il a été exposé au chapitre précédent.

Si l'antigène dilué à $1/X$ a été entièrement consommé par la réaction première, dans le tube à hémolyse avec le sérum de malade, il ne sera plus disponible et la précipitation n'apparaîtra pas. Par contre, il doit toujours y avoir précipitation entre l'immun sérum et le mélange témoin.

Nous avons pu ainsi constater la consommation de quantités variées d'antigène suivant les sérums étudiés.



A = Immum sérum riche en anticorps.

B = Antigène dilué au 1/X + sérum de malade.

C = Antigène dilué au 1/X + sérum témoin.

3- Réaction de fixation du complément.

Nous pratiquons depuis quelque temps une réaction de fixation du complément, parallèlement aux réactions en gélose ; nous appliquons aux sérums que nous étudions la technique de Kolmer, telle qu'elle est utilisée pour le diagnostic de la syphilis. La technique est celle de la réaction de Kolmer simplifiée par LAPORTE avec fixation lente, à froid (15 à 18 h. à + 6°), en utilisant un antigène aspergillaire isoténique et titré (Cf. Matériel antiqénique).

On notera que cette réaction est possible grâce au très faible pouvoir anticomplémentaire de notre antiqène.

4- Immunélectrophorèses.

A la suite des données récentes de GERNEZ-RIEUX et coll. (7), nous avons appliqué la technique de GRABAR à l'étude de nos sérums et de nos antigènes. Nous pratiquons donc, depuis quelque temps et paral-

lèlement aux méthodes énoncées plus haut, des immuno-électrophorèses systématiques ; nous séparons par le champ électrique les diverses fractions antigéniques de notre milieu et nous révélons la présence d'anticorps correspondants dans le sérum des malades par introduction de celui-ci dans la gouttière longitudinale à partir de laquelle s'effectue la diffusion en gélose, et la précipitation, deuxième temps de l'immuno-électrophorèse.

Ces travaux sont en cours ; il est indéniable, ainsi que l'ont montré les auteurs précédemment cités, que cette technique apporte des renseignements d'un intérêt scientifique considérable ; cependant, la réalisation en est délicate et laborieuse. Notre but fut avant tout la simplicité et la notion quantitative, afin d'orienter rapidement le clinicien toujours impatient.

APPLICATION CLINIQUE

Grâce au caractère de spécialisation du Centre chirurgical Marie Lannelongue et à la bienveillante collaboration de nombreux médecins français et étrangers, nous avons pu étudier un nombre intéressant de malades :

Aspergillomes	14
Aspergilloses broncho-pulmonaires.....	2
Pleurésies aspergillaires.....	3
Surinfection sur cavité tuberculeuse.....	1
Aspergillose des muqueuses.....	1
Sujets non vérifiés (1).....	3
Divers	63
Total des malades étudiés.....	87

Les sujets classés dans le titre "Divers" sont des malades qui, après avoir été étudiés sur le plan mycologique à la demande des cliniciens, se sont avérés porteurs d'une affection d'un tout autre ordre : tuberculose, abcès, tumeur maligne, cardiopathie, virose... On remarquera que les aspergillomes sont de loin la manifestation la plus fréquente qu'il nous

(1)- Nous entendons par sujets non vérifiés des malades considérés cliniquement et radiologiquement comme aspergillaires, mais dont nous avons perdu la trace avant d'avoir pu faire la preuve bactériologique ou anatomo-pathologique de leur atteinte mycosique.

a été donné d'observer, cela pour deux raisons : le caractère chirurgical du Centre Marie Lannelongue d'une part, la fréquence de cette forme d'aspergilliose d'autre part.

I.- Précipitation en gélose.

a- Etude de sérums purs.

Les résultats obtenus (Cf. tableau) confirment les travaux effectués chez l'animal et l'application en pathologie humaine commencée ces dernières années.

(Cf. page 27)

On pourra remarquer sur ce tableau que :

- Nous avons toujours trouvé des précipitines chez les malades aspergillaires qu'il nous a été donné d'étudier.

- Deux malades (21 et 22) appelés "non vérifiés" présentaient les signes cliniques d'une atteinte aspergillaire et étaient considérés comme tels par leurs médecins traitants ; mais, à notre connaissance, aucun isolement du champignon n'avait été pratiqué et la trace du malade fut perdue avant que nous ayons pu le faire nous-même. Quant au malade N° 24, il s'agit d'un très grand accidenté de la route, polytransfusé, qui nous a toujours donné d'excellentes précipitines, mais chez qui de plus amples investigations à la recherche d'une atteinte mycosique n'ont pu être pratiquées. Il faut noter que nous avons obtenu avec le sérum de ce malade 7 arcs de précipitation à l'immuno-électrophorèse.

- Enfin, jamais nous n'avons eu de précipitines chez les 63 malades porteurs d'affections diverses.

Mais ce tableau, s'il est très explicite, donne des résultats qualitatifs, sans préjuger du degré de

Malades	Diagnostic clinique	Précipitines
1 - GAU.	Aspergillome	+
2 - BRU.	"	+
3 - DUR.	"	+
4 - DUF.	"	+
5 - REV.	"	+
6 - STRA.	"	+
7 - SOU.	"	+
8 - GAI.	"	+
9 - LEP.	"	+
10 - COM.	"	+
11 - WAN.	"	+
12 - JAN.	"	+
13 - MAS.	"	+
14 - FOU.	"	+
15 - REN.	Aspergilliose des muqueuses	+
16 - BAR.	Aspergilliose broncho-pulmonaire	+
17 - KOU.	"	+
18 - MUR.	Pleurésie aspergillaire	+
19 - ROL.	"	+
20 - TRE.	"	+
21 - BOU.	Non vérifié (Aspergillome ?)	+
22 - BUR.	Non vérifié (Muqueuse + Généralisation ?)	+
23 - COR.	Surinfection sur cavité tub. ancienne	+
24 - FAZ.	Polytraumatisé non vérifié	+
63 malades divers	Exempts d'aspergilliose cliniquement et radiologiquement décelable	Tous négatifs

positivité de chaque réaction. Nous n'avons pas toujours obtenu des résultats identiques. En effet, nous avons appelé réaction positive toute réaction donnant lieu à au moins un trait de précipitation, net et bien tracé ; mais si certains sérums ne nous ont donné qu'un seul trait, d'autres, dans des conditions identiques, nous en ont donné plusieurs :

Malades	1 trait	2 traits	3 traits	4 traits	5 traits
Aspergillomes	8	3	2	0	1
Aspergillozes broncho-pulm. diffuses			1	1	
Pleurésies et aspergillozes muqueuses	2	1	0	1	
Total	10	4	3	2	1

Il est difficile d'interpréter ces résultats, car on sait que les antigènes aspergillaires sont multiples (GERNEZ-RIEUX et coll. - 6). De plus, les souches n'ont pas toutes la même activité antigénique, l'organisme du malade intervient par sa particularité dans la production d'anticorps, et enfin le type d'infestation et de développement du champignon dans l'organisme joue un rôle certain. Il est probable que, dans de nombreux cas, soit par le fait de la souche, soit par celui du malade, il n'y a production que d'une partie des anticorps, à l'inverse de ce qui a été obtenu expérimentalement chez l'animal par inoculations successives (PEPYS et coll. - 16).

Enfin, nous avons parallèlement expérimenté un certain nombre de sérums de malades asthmatiques et, à la suite des travaux de PEPYS et coll. (17), on pouvait penser obtenir quelques renseignements supplémentaires quant à la pathogénie de certains asthmes ; pour notre part, nous n'avons encore obtenu aucune précipitine chez ces sujets avec nos antigènes aspergillaires.

b- Dilutions.

On sait, en séro-immunologie, que les réactions passent par un optimum pour un certain rapport antigène - anticorps caractéristique du système. C'est pourquoi nous avons procédé à des dilutions des produits en présence.

La dilution des sérums a montré que leur concentration en anticorps est toujours relativement faible; il ne nous a jamais été possible d'obtenir une réaction positive après dilution même au $1/2$; cela n'est pas pour nous étonner, car d'une part certains, avec PARLETT et YOUNANS (14), pensent qu'une quantité trop grande d'antigène chez un malade maintient, pendant un temps, un taux assez bas d'anticorps circulants ; d'autre part, de nombreux auteurs s'accordent à penser que l'activité antigénique des champignons est indiscutable et spécifique mais relativement faible.

Par contre, la dilution de notre antigène a montré sa concentration en facteurs antigéniques et les résultats ont été positifs pour tous nos sérums à des dilutions allant jusqu'au $1/64$. Nous avons pu, pour deux de nos malades, obtenir ainsi une plus grande netteté des traits de précipitation, rendus flous probablement par un excès d'antigène.

c- Etudes de spécificité.

Les antigènes préparés à partir de souches fournies par l'Institut Pasteur de Paris ont été étudiés chez cinq de nos malades, simultanément avec ceux obtenus avec les souches d'*Aspergillus fumigatus* isolées par culture à partir de produits pathologiques humains.

Quoique nous ayons obtenu des réponses variées, il ne nous a pas été possible de faire une distinction antigénique des souches. Il existe très probablement des antigènes de genre, d'espèce, de type, mais la réaction simple, en gélose, n'est pas assez fine pour obtenir des distinctions suffisantes entre ces diver-

ses précipitations.

Il faut pourtant noter que les résultats ont, pour quelques antigènes, une certaine constance :

Malades	Antigènes étudiés												
	Terreus	Wenti	Sydowi	Glaucus repens prolifé- rants	Versicolor	Fumigatus	Clavatus	Niger	Nidulans	Roseus	Flavus	Candidus	Janselmei
MUR.	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
DUT.	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
COM.	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
BUR.	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KOU.	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Nous n'avons considéré pour ce tableau que la positivité ou la négativité de la réaction, c'est-à-dire la présence ou l'absence de précipitines. En effet, seul le sérum de Monsieur COM. nous a donné des réactions différentes parmi les précipitines obtenues : nous avons toujours obtenu chez ce malade deux traits de précipitation de plus avec l'antigène d'*Aspergillus clavatus* qu'avec les autres antigènes donnant une réaction positive. Il est regrettable que nous n'ayons pu avoir connaissance de la souche présente dans l'aspergillome de ce malade. Mais on ne peut, outre cela, retenir de ce travail que la concordance entre *Aspergillus terreus* et *Aspergillus niger*, ainsi que l'absence totale de réaction avec l'*Aspergillus Wenti*.

Il est évident qu'à l'heure présente, seule l'étude immuno-électrophorétique peut apporter dans ce domaine des précisions scientifiquement indiscutables, ainsi que l'ont montré GERNEZ-RIEUX et coll.(7).

De nos essais de spécificité, nous avons seulement retenu le fait que les cultures réalisées à partir de souches isolées/^{chez} l'homme malade sont beaucoup plus fortement antigéniques que les souches de laboratoire obtenues par de nombreux repiquages.

II.- Réactions quantitatives.

a- Réaction d'inhibition de précipitation par consommation d'antigène.

Huit de nos sérums ont pu être étudiés ainsi, selon la technique exposée plus haut, par inhibition de la précipitation. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Dilutions d'antigène inhibées

	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
DUT.	-	-	-	-	+	+
DUP.	-	-	-	+	+	+
BUR.	-	-	-	+	+	+
ROL.	-	-	-	+	+	+
REV.	-	-	-	+	+	+
TRE.	-	+	+	+	+	+
COM.	-	+	+	+	+	+
KOU.	+	+	+	+	+	+
Témoins	-	-	-	-	-	-

Le signe + représente l'inhibition par consommation de la quantité étudiée.

Le signe - représente l'absence d'inhibition de cette dilution, donc la réaction négative.

Il ressort de ces résultats que les sérums de nos malades ont la propriété d'inhiber par consommation des doses différentes d'antigène, dans des conditions absolument identiques.

Il s'agit donc là d'une réaction quantitative quant à la richesse en anticorps du sérum de nos malades et nous avons choisi de chiffrer la quantité d'anticorps présents dans les sérums par une échelle numérique traduisant la quantité d'antigène inhibée. L'échelle va de 1 pour le 1/32e à 32 pour le pur, par progression géométrique inverse des dilutions. Rappelons (Cf. plus haut) que nous commençons au 1/32, car au 1/64 la réaction ne peut être étudiée ; le seul fait de la dilution excessive entraîne une extinction de la réaction par défaut d'antigène, même avec les témoins.

Pour les huit malades figurant sur le tableau précédent, nous avons donc obtenu la quantité d'anticorps suivante :

DUT...	2	unités anticorps
DUP...	4	" " "
BUR...	4	" " "
ROL...	4	" " "
REV...	4	" " "
TRE...	16	" " "
COM...	16	" " "
KOU...	32	" " "
Tous les témoins :	0	" " "

b- Réaction de fixation du complément.

Nous n'étudions cette réaction dans l'aspergil-

lose que depuis peu de temps ; néanmoins, il nous a été possible d'en vérifier l'intérêt.

Nous n'avons trouvé, jusqu'à présent, aucune fausse réaction chez 15 de nos malades pris au hasard de la pathologie cardio-pulmonaire.

Des expériences actuellement en cours nous ont déjà permis d'étudier quantitativement (en réalisant, ainsi qu'il est décrit plus haut, des réactions de Kolmer rendues quantitatives par dilutions de sérum) cinq sérums de malades déjà étudiés en consommation d'antigène ; nous avons obtenu les résultats suivants:

Sérums étudiés	Dilutions de sérum					
	pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
DUP.	+++	+++	+++	++	-	-
ROL.	+++	+++	+++	-	-	-
KOU.	+++	+++	+++	+++	++	+
TRE.	+++	+++	+++	+++	++	-
COM.	+++	+++	+++	++	++	-

Nous avons traduit ces résultats en unités, de la même façon que nous avons procédé pour les inhibitions par consommation d'antigène, mais sans qu'il soit nécessaire de pratiquer une inversion des chiffres, puisque ici nous utilisons des dilutions de sérum dont nous pouvons prendre le dénominateur comme unité d'anticorps. Nous avons donc pour résultats :

DUP... 8 unités anticorps
ROL... 4 " "

KOU... 32 unités anticorps
 TRE... 16 " "
 COM... 16 " "

La comparaison des résultats de cette technique avec ceux de l'inhibition de précipitation par consommation cités précédemment nous a montré une intéressante équivalence de résultats quant au taux d'anticorps circulants chez ces malades.

	U n i t é s	
	Consommation d'antigène.	Kolmer quantitatif
TRE.	16	16
DUP.	4	8
COM.	16	16
KOU.	32	32
ROL.	4	4

Il faut remarquer que, dans la fixation du complément quantitative, les résultats sont obtenus par dilution des sérums de malades, alors que, dans la technique d'inhibition de précipitation par consommation d'antigène, nous procédons à des dilutions de celui-ci.

Le parallélisme de ces résultats nous invite à poursuivre nos recherches avec des antigènes à titre constant (grâce à la lyophilisation des éléments de référence), ayant eu la chance de travailler avec un antigène qui nous semble de titre favorable.

Ces diverses réactions nous apparaissent d'un grand intérêt quoique d'interprétation encore diffi-

cile, les relations entre la richesse en anticorps et l'importance et la gravité de l'atteinte mycosique étant encore peu connues. D'aucuns pensent que la présence d'une trop grande quantité d'antigènes circulants entraînerait chez le malade un taux d'anticorps bas ; nous avons, dans notre travail, le cas de Monsieur KOU., hospitalisé dans le Centre de réanimation de l'Hôpital Saint-Antoine à Paris, qui présentait une très grande quantité d'anticorps circulants libres, puisqu'il présentait 32 unités aux diverses expériences répétées avec son sérum, chiffre que n'a atteint aucun autre de nos sérums étudiés à ce jour ; or, ce malade était porteur d'une aspergillose muqueuse pratiquement généralisée avec atteinte broncho-pulmonaire grave au point d'avoir nécessité la trachéotomie et une respiration assistée.

Nous ne possédons pas encore un recul suffisant pour tirer tous les enseignements que peut nous apporter cette méthode ; mais bien qu'il appartienne de préciser les relations exactes entre l'infestation clinique et les réactions humorales, il nous semble que ce soit l'aspect quantitatif de la réaction qui puisse donner aux praticiens les renseignements les meilleurs ; mais nous n'avons cette opinion qu'avec une grande prudence, ne pratiquant ces réactions que depuis peu de temps.

III.- Etude de l'évolution sérologique en fonction de l'évolution clinique et de la guérison.

Nous avons pu étudier l'évolution des anticorps et de la clinique chez huit de nos malades :

= Mr. DUT.

Novembre 1962 : présence de précipitines.

Décembre 1962 : intervention apico-dorsale permettant l'exérèse d'un aspergillome.

Mai 1963 : réactions très faibles.

Octobre 1963 : soit 9 mois après l'intervention, les précipitines ont complètement disparu.

= Mr. MAN.

1961 : présence de précipitines à l'Institut Pasteur de Paris, lors d'un épisode aigu chez cet ancien tuberculeux bilatéral.

Décembre 1962 : mise à plat, à Hauteville, d'un aspergillome pleural ; bonne cicatrisation.

Octobre 1963 : soit 10 mois après l'intervention, il n'y a plus de précipitines.

= Mme STRA.

1961 : présence de précipitines à l'Institut Pasteur de Paris.

Mai 1961 : exérèse d'un aspergillome.

Juillet 1961 : présence de précipitines.

Août 1963 : soit deux ans et trois mois après l'intervention, pas de précipitines.

= Mr. MER.

Mai 1963 : lobectomie supérieure pour aspergillome.

Fin Octobre 1963 : soit cinq mois et demi après l'intervention, absence de précipitines.

= Mr. BAR.

En 1962, à Hauteville, spéléotomie en deux temps pour aspergillome greffé sur cicatrice d'abcès du poumon.

En 1963, quinze mois après l'intervention, il n'y a pas de précipitines.

= Me. DEL.

1961 : rechute d'une tuberculose ancienne, bonne réaction au traitement, mais épisode aigu lors de l'hospitalisation à Hauteville ; on trouve alors un *Aspergillus fumigatus* dans la plèvre et dans l'expectoration.

Janvier 1963 : thoracoplastie du sommet gauche et décortication pleurale ; très bons résultats.

Octobre 1963 : soit neuf mois après l'intervention, pas de précipitines.

= Mr. FOU.

1961 : présence de précipitines.

1962 : intervention pour aspergillome.

Octobre 1963 : il n'y a plus de précipitines dans son sérum.

On remarquera que, chez trois de ces malades, nous n'avons pas la notion de précipitines recherchées avant l'intervention ; cependant, les dates retrouvées chez eux sont en concordance avec celles de nos autres malades suivis depuis le début de leur affection, et la réalité de l'atteinte pathologique par un *Aspergillus* vérifiée par l'intervention ne faisant aucun doute, nous les avons inclus dans cette étude.

Nous citerons enfin le cas de :

= Mme GAU.

Juillet 1962 : présence de précipitines.

Août 1962 : opération pour aspergillome.

Mai 1963 : soit neuf mois après l'intervention, revient consulter pour hémoptysie ; une recherche de précipitines est alors positive ; l'examen montre une fistule bronchique avec poche pleurale dans laquelle on retrouve *Aspergillus fumigatus*.

On peut déduire de ces observations que l'étude des précipitines est un apport fondamental dans la recherche de l'état évolutif du malade :

	Date du dernier contrôle positif après intervention	Date du 1er contrôle négatif après intervention
DUT.	5 mois	9 mois
MAN.	Non pratiqué	10 mois
STRA.	2 mois	27 mois
MER.	Non pratiqué	5 mois $\frac{1}{2}$
BAR.	Non pratiqué	15 mois
DEL.	Non pratiqué	9 mois
FOU.	Non pratiqué	9 mois
GAU.	9 mois	Rechute

Il nous apparaît que, chez un malade aspergillaire, il ne doit plus y avoir d'anticorps décelables par la recherche de précipitines neuf mois après la guérison. Le cas de Madame GAU.. illustre le fait que la persistance de précipitines doit faire suspecter une rechute.

Nous n'avons pu étudier l'évolution quantitative

des anticorps que chez un seul de nos malades, par la technique d'inhibition de précipitation par consommation d'antigène. Néanmoins, nous ne doutons pas que cette technique doive apporter dans l'étude de l'évolution du taux des anticorps chez les malades traités, une précision que les cliniciens apprécieront dans le contrôle de la guérison et la prévention des rechutes. Ce malade, Mr. DUT..., présentait un aspergillome :

Novembre 1962 : 8 unités anticorps dans le sérum.

Décembre 1962 : intervention apico-dorsale et exérèse de l'aspergillome.

Mai 1963 : 2 unités anticorps.

Octobre 1963 : 0 unité ; le sérum a perdu tout pouvoir d'inhibition.

Soulignons le caractère progressif de la disparition des anticorps chez ce malade. Il nous semble que, si notre résultat de neuf mois se confirme comme date limite à partir de laquelle la persistance d'anticorps devrait faire suspecter une rechute, les précisions que pourrait apporter notre technique quantitative seraient un apport indéniable au contrôle de l'évolution humorale de la maladie.

CONCLUSIONS

Nous avons confirmé la présence, dans le sérum des malades aspergillaires, d'anticorps précipitants spécifiques.

Nous nous sommes efforcé d'apprécier quantitativement le taux d'anticorps circulants chez nos malades. Pour ce faire, nous avons mis en oeuvre deux méthodes qui nous ont fourni des résultats concordants :

- Méthode d'inhibition de la précipitation par consommation d'antigène.

- Méthode de fixation du complément.

Nous donnons la préférence à la première de ces méthodes, pour laquelle nous avons une certaine expérience ; mais il n'est pas douteux que la fixation du complément, par sa simplicité, n'acquière rapidement l'adhésion générale, si toutefois nos premiers résultats sont confirmés.

Nous avons étudié l'évolution des anticorps aspergillaires chez les malades et nous avons pu déduire de nos observations leur disparition neuf mois environ après la guérison.

En résumé, nous proposons une technique sérologique simple d'inhibition de précipitation par consommation d'antigène, permettant, grâce à un matériel antigénique titré, de suivre quantitativement l'évo-

lution des anticorps chez les sujets atteints d'aspergillose.

VU & PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur
de l'Académie de Paris,

J. ROCHE

Le Doyen de
la Faculté de Médecine,

G. CORDIER

Le Président
de la thèse,

P. BARBIER

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ANSLOW et RAISTRICK - Studies in the biochemistry of microorganisms.- Biol. Chem. J. 1938, 32, 687.
- 2- ASHESHOW et STERLITZ - Antibiotic substance active against Mycobacterium tuberculosis.- Science, 1945, 101, 119.
- 3 - BIGUET, HARVEZ et TRAN VAN KY - Les possibilités d'application aux champignons pathogènes de la méthode d'Ouchterlony et de l'immuno-électrophorèse.- Myk., 1959, 2, 115.
- 4 - BOUGUEN - Essais cliniques de mycothérapie par les extraits injectables d'*Aspergillus fumigatus*.- Thèse, Paris, 1947.
- 5 - DROUHET, SEGRETAÏN, PESLE et BIDET - Valeur de la recherche des précipitines sériques en milieu gélifié pour le diagnostic des aspergilloses pulmonaires.- J.F. de Méd. et Chir. thor., 1963, 17, 655.
- 6 - GERNEZ-RIEUX, BIGUET, VOISIN, CAPRON et TRAN VAN KY - Diagnostic immunologique des aspergilloses broncho-pulmonaires.- Presse Médicale, 1963, 71, 31, 1541.
- 7 - GERNEZ-RIEUX, BIGUET, VOISIN, CAPRON, BALGAIRIES

- et TRAN VAN KY - Diagnostic sérologique des aspergillooses broncho-pulmonaires par immuno-électrophorèse.- J.F. de Méd. et Chir. thor., 1963, 17, 663.
- 8 - LACHAUX - Substances antibactériennes retirées des microorganismes.- Semaine des Hôpitaux de Paris, 1945, 37, 1039.
- 9 - LALLEMANT et TOMATIS - Utilisation thérapeutique d'extraits aspergillaires.- Médecin Français, Avril 1947.
- 10 - MACAIGNE et NICAUD - Recherche sur les réactions antigéniques dans l'aspergillose.- C.R. Soc. Biol., 1927, 96, 446.
- 11 - MORTON et DODGE - Modifications of the agar double-diffusion precipitin test for tuberculosis.- Am. Rev. of Resp. Dis. 1963, 88, 265.
- 12 - OUCHTERLONY - Antigen-Antibody reaction in gel.- Ark. Kem., 1948, 26, 1.
- 13 - PARENT - Antibiotiques élaborés par les Aspergilli. Thèse de Doctorat vétérinaire, Paris, 1948.
- 14 - PARLETT et YOUNG - An evaluation of the specificity and sensitivity of a gel double diffusion test for tuberculosis.- Am. Rev. of Resp. Dis., 1959, 2, 153.
- 15 - PASTEUR VALLERY-RADOT et GIROUD - Sporomycose des pellateurs de grains.- Bull. Soc. Méd. Hôp., 1928, 52, 1632.
- 16 - PEPYS - Recherches sérologiques dans l'aspergillose.- Bull. Soc. F. Mycol. Méd., n° 3 -

Séance du 19 Juin 1961.

- 17 - PEPYS et LONGBOTTOM - Comparison of antigens and allergens in *Aspergillus fumigatus* and *Epidermophyton floccosum*. - Acta Allergologica, 1962, 17, 188.
 - 18 - PEPYS, RIDDEL, CITRON et coll.- Clinical and immunologic significance of *Aspergillus fumigatus* in the sputum.- Am. Rev. of Resp. Dis., 1959, 80, 167.
 - 19 - SEELIGER - Phénomènes d'immunité dans les cryptococcoses.- Path. Biol. 1960, 3-4, 297.
 - 20 - SOLTYS - Antibiotic action of *Aspergillus fumigatus* against *Mycobacterium tuberculosis*.- Nature, 1949, 154, 550.
 - 21 - VAUDREMER - Action de l'extrait filtré d'*Aspergillus fumigatus* sur les bacilles tuberculeux.- C.R. Soc. Biol., 1913, 74, 278.
 - 22 - WAKSMAN, HORNING, SPENCER - *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus clavatus* and their antibiotic substances.- J. Bact., 1943, 45, 233.
 - 23 - ZAMPIERI - Produzione di estretti microbici mediante criomacinazione dei corpi batterici.- Atti. Acc. Naz. dei Lincei, 1959, 8, 265.
-

